

## 埋土種子調査を伴う実験における必要反復数

中山 壮一\*

Appropriate number of experimental replications in seed bank research.

Soichi Nakayama\*

キーワード：埋土種子，検定，反復数，検出力，ポアソン回帰

### はじめに

埋土種子調査の，雑草研究および雑草管理における重要性，ならびにその具体的な手法については古くから論じられてきた (Leck *et al.* 1989)。近年我が国においても，環境保全志向の高まりとともに埋土種子調査の重要性が再認識されつつある (小林・渡邊 2010)。こうした背景から農業・食品産業技術総合研究機構はプロジェクト研究「難防除雑草の埋土種子診断と個体群動態－経済性評価統合モデルに基づく総合的雑草管理 (IWM) の検証」を実施した。その中で埋土種子調査法の確立はプロジェクトの1つの柱として集中的に取り組みられた。これら取り組みの成果は，「雑草研究」誌における特集「難防除雑草の埋土種子調査」として，国内外の既往の成果とともに総説にとりまとめられた (小林・渡邊 2010；澁谷ら 2010；浅井ら 2010；住吉ら 2011；中山ら 2011)。

これらの総説のうち，中山ら (2011) は埋土種子調査における必要サンプル数について主に論じたが，そこでの議論は，その緒言に述べられたとおり「推定精度は少々劣ってもかまわないから，多数の現地圃場の埋土種子量の推定量を，実現可能なサンプル数で得ることができないか，あるいはそれが実現可能な条件，すなわち種子量とそのばらつきは，どのようなレベルにあるかについて検討した」ものであった。このため，研究場面において埋土種子調査を伴う実験を行う際，反復をいくつ設けたら埋土種子量の差を統計的に有意な差として検出できるのか，あるいは個々のプロットの管理やそこからのサンプリングをどのように行ったら効率的か，といった

疑問に対しては十分な議論を行っていない。そこで本稿では，埋土種子数の変動に対する統計検定の検出力を指標とし，実験の必要反復数について論じた。また後段では実験を効率的に行うための管理法やサンプリング法について述べた。

### 検出力

中山ら (2011) においては，現地圃場での埋土種子調査を念頭に推定精度  $D$  (相対標準誤差) を指標として必要サンプル数を求めた。この必要サンプル数－推定精度の関係において，サンプル数  $\rightarrow$  反復数と読み替えるだけで処理平均値の推定精度  $D$  に対する必要反復数を求めることができる。しかし実験の場合，平均値の推定精度も重要ではあるが，興味の対象は処理効果の有無，特にそれが統計的に有意であるか否かである場合が多いと思われる。そこでここでは統計検定の検出力 (検定力とも呼ばれる) を指標として必要反復数を考える。もちろん検定の検出力はデータから得られた平均値の推定精度に依存しているし，推定精度はデータのバラツキ，すなわち分散に依存している。さらにはデータの分散は，供試圃場における埋土種子の空間分布と強く関連している。この点は中山ら (2011) が述べた調査の場合と同様である。

よく知られているように検定では2種類の誤り，すなわち第1種の誤りおよび第2種の誤りを犯す可能性がついてまわる。その確率は，それぞれ  $\alpha$  と  $\beta$  で表されるのが普通であるが，検出力は，第2種の誤り (母集団平均に違いがあるのにデータによる検定では，有意差として

\* 農業・食品産業技術総合研究機構 〒020-0198 盛岡市下厨川字赤平4

National Agriculture and Food Research Organization, Morioka, Iwate 020-0198, Japan

```

# 反復数と検出力：ポアソン分布の場合
# -----
p<-0.05 # 有意水準
q<-c (2,3,4,5,6,7,8,9,10,16,32) # 反復数
m1<-8 # 平均1 (小さい方)
t<-1.3 # 処理効果
m2<-m1 * t # 平均2 (大きい方)
n<-1000 # シミュレーションの試行回数
# -----
Sg<-rep(0,length(q))
RNGkind("Mersenne - Twister")
for(h in 1 : length(q)) {
  nd<-q[h] * 2 # データ数
  for(i in 1 : n) {
    x<-rep(0, nd)
    y<-rep(0, nd)
    for(j in 1 : nd) {
      if(j>q[h]) {
        x[j]<-2
        y[j]<-rpois(1,m2)
      } else {
        x[j]<-1
        y[j]<-rpois(1,m1)
      }
    }
    df<-data.frame(X = x, Y = y)
    fit<-glm(Y~., family = poisson, data = df)
    t_dev<-anova(fit, test = "Chisq")
    if(t_dev[2,5]<p) {Sg[h]<-Sg[h]+1}
  }
}
}# i
}# h
Sg/n

```

第1図 ランダム分布する埋土種子集団から得られた2平均値間の差の検出力を求めるためのRスクリプト：任意の有意水準 (p), 反復数 (q), 比較しようとする2つの平均値のうちの小さい方 (m1) および処理効果 (t) を指定することでポアソン回帰による検出力を出力する。

検出できない誤り) を犯さない確率  $1 - \beta$  として定義される。つまり、母集団が違ふとき、データ解析により統計的有意差がちゃんと検出できる確率である。

### 必要反復数

正規性と等分散性を仮定できるデータであれば、パッケージソフトに、検出力や必要反復数の計算を行う機能が備わっている。例えば、2つの平均値の比較であれば、R (R Development Core Team 2010) では、`power.t.test()` 関数により検出力や必要反復数の計算が可能である。ところが埋土種子数データについては、通常は正規分布と等分散性を仮定できないことから、このような既存のツールを用いて良いのか判断が難しい (蓋然的には、検出すべき差が小さい場合は、必要反復数が多くなり正規分布による近似が可能と考えられるが)。非正規、非等分散

データについて、検出力や必要サンプル数を解析的に求めることは統計科学の専門家に委ねるほかないが、実用的には想定される任意の数組の平均値と分散を与え適当な乱数を発生させて検定を繰り返すシミュレーションにより、任意の反復数に対する検出力の計算が可能である。こうした計算機を用いたシミュレーション実験は、数学や統計学が専門でない私たち農学研究者にも、対応すべき個別の問題に対する様々な統計手法の適用条件など有用な情報を与えてくれる。以下にシミュレーションの概要と結果を述べた。

最も単純な、2つの平均値の違いの検定について考える。イメージしやすい様、ある雑草の土中種子の減耗に対して秋耕の処理効果の有無を圃場実験で明らかにしたいとの具体例を仮定しよう。比較しようとしている2つの平均値は、秋耕したプロットの種子数の平均 (個々のプロット内の平均値 (代表値) ではなく、プロットの代表値間の平均である点に注意) と秋耕しなかったプロットの種子数の平均である。

現実の圃場における雑草埋土種子の分布は、空間的にランダムに分布していることはまれであり、集中分布しているのが普通だが、ここでは実験圃場全体が理想的に管理されているという仮定の下にランダム分布を考える。この場合、得られる埋土種子数データの頻度分布はポアソン分布に従う。そこで平均の異なる2つのポアソン乱数により (ポアソン分布は [平均] = [分散] の性質を持つので、分散の指定は必要ない) 処理区および無処理区の埋土種子データをシミュレートし、ポアソン回帰により検定を行った。

具体的な検出力の計算はR上で第1図のスクリプトで行った。有意水準 (p) は5%とし (3行目), 2反復から32反復までの11段階の反復数について計算を行った (4行目)。4行目の "c ()" 内に、任意の反復数を書き込むと、その反復数に対応した検出力が計算できる。ここでは作表のため11段階の反復数について計算させたが、例えば3反復だけの検出力を計算したい場合は、"c (3)" とすれば良い。2つ平均の内、小さい方が平均1 (m1), 大きい方が平均2 (m2) で、処理効果 (t) は、[処理効果] = [平均2] / [平均1], すなわち2つの平均値の比で表すことにする。第1図では、[平均1] = 8 (5行目), [処理効果] = 1.3なので、[平均2] =  $8 \times 1.3 = 10.4$  となる (6行目)。シミュレーションの繰り返し回数 (n) は、第1図の8行目では1000回としてあるが、実は、この程度の繰り返し回数だと、検出力として出力される数字の少数第2位は、計算に用いる乱数列により大きく振れる。多くの場合、検出力を精密に計算する必要は無いと思われるので、この程度でも十分かもしれないが、小数第2位まで示した第1表は100000回の繰り返し計算を行っている。ちなみに反復数を11段階設定した100000

回の繰り返し計算には数時間を要した。試しにスクリプトを走らせてみようという場合は1000回程度が良いだろう。

10行目以下が実際の計算となる。17行目～24行目で平均が8 (ml) のポアソン乱数および平均が10.4 (m<sup>2</sup>) のポアソン乱数をそれぞれ反復数分だけ発生させる。26行目でポアソン回帰を当てはめて、27行目で $\chi^2$ 近似による尤度比検定を行い逸脱度分析表を `t_dev` に出力する。28行目では、処理の有無による有意確率(逸脱度分析表の2行目5列目)とp値(=0.05)を比較し、有意であればSgにカウントする。これを反復数別に1000回繰り返して(この場合、11段階の反復数について計算しているので、合計11×1000回の検定を繰り返す)。最後に、有意になった回数をシミュレーションの繰り返し回数(n)で割って検出力を得ている(31行目)。

第1表にシミュレーション結果を示した。検出力の目標値は実験の目的により様々であろうが、一般には検出力が80%あれば設定された $\alpha$ (第1表では0.05に設定)に対して妥当なサンプルサイズであったと考えることが多い(大東2011)。ここでも検出力80%を目標値とし、第1表では0.8以上の値を太字で示した。例えば秋耕の効果が平均値に5割程度の差をもたらすと期待される(あるいは5割以上の差はちゃんと検出したい)とき( $t=1.5$ )、種子量の平均が20程度(16 vs. 24)であるなら5反復の実験が必要であることが解る。

ところで第2表の結果を基に、総調査種子数( $[(\text{平均}1) + (\text{平均}2)] \times [\text{反復数}]$ )を計算すると、処理効果および検出力が一定の条件では反復数によらず総調査種子数は一定になることがわかる(処理効果4倍の欄の検出力0.81の場合に注目すると解り易い)。この関係は、ランダム分布する種子の総調査数と精度の関係(中山ら2011)と同様であるが、埋土種子量など計数データの測定を伴う実験の計画段階において有用な情報となるだろう。おおざっぱな数字ではあるが、処理効果の大きさとともに、検出力0.8に対する必要総調査種子数を第2表にまとめた。

以上は、土中種子の空間分布がランダムな場合の結果である。繰り返しになるが、実際の圃場の埋土種子分布は[平均] < [分散]である集中分布をしているのが普通である。その場合、検出力は第1表の値よりも下がり、検出力を維持するためにはより多くの反復数、総調査種子数が必要となる。第1表、第2表から示される必要反復数、総調査種子数は、理想的な状況下での最低限の値であり、これを下回るようでは、実験目的の達成が不確実な実験計画と言わざるを得ない。

## 実験を効率的に行うために

研究所や試験場で行われる実験の場合、現地の埋土種子調査に比べると調査作業に対する労力的な制約は緩いかもしれない。しかしその反面、圃場面積の制約などで、必要な反復数と必要なプロットのサイズとを両立することが困難な場合も生じるだろう。そうした制約を緩和するには、やはり可能な限り実験を効率的に行うことが求められる。以下に、実験を効率的に行うための実験区の実験区管理法およびサンプリング法について述べた。なお効率的な実験のためには、どのような実験計画法によるか(例えば直行表による割り付けを行うなど)も重要であるが、この点については、優れた解説書等が多数存在することから、ここでは触れることはしない。

### 1) 実験を始めるに当たって

実験の場合、現地調査と異なり、供試圃場における埋土種子の空間分布について事前情報が全くないということはむしろまれだろう。前年の雑草発生状況からおおざっぱにでも、あるいは事前に埋土種子調査を行うことでより精密に供試圃場の種子分布を把握し、埋土種子分布に応じたブロック化など実験計画に反映させることは、効率的に実験を行う上で重要である。

また除草剤の適用性試験で行われているように、試験区に供試雑草の種子または育成圃場の土を散布したり、実験前年に種子散布を目的に供試雑草を育成したりすることも有効である。こうした操作は実験圃場内の種子密度を高める(従って平均値も大きくなる)と同時に種子分布を均一化しランダム分布に近づけることから、同じ反復数でも検出力を高めるのに有効である(平均値を大きくする効果はないが、場合によっては実験圃場内で種子密度が高い部分の土を集めて実験圃場全面散布することも良いだろう)。ただし検出力を高める、あるいは反復数を減らすことだけに専心して、現実離れた極端に多量の種子を散布してしまうと、そこから得られる結果もまた現実離れたものになる可能性については留意の必要がある。

圃場の種子密度の操作が困難な場合も、分析する土の量を増やすことで平均値を大きくすることが可能である。使用器具の容量などで一度に分析できる土の量が決まっている場合は、各プロットから複数回の測定を行い、合計値をプロットの代表値とすれば良い。ただし、この方法は、圃場内の種子分布がランダムな場合には反復数を増やすのと同等の効果が期待できるが(第2表)、集中分布している場合には、反復数を増やした方が同じ分析土壌の量に対する効率は高い。

第1表 ランダムな埋土種子分布における処理効果および反復数に対する検出力の反応<sup>1)</sup>

平均1	平均2 t = 10 <sup>2)</sup>	反 復 数										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	32
0.03125	0.3125	0.02	0.06	0.12	0.18	0.24	0.31	0.36	0.42	0.47	0.66	0.89
0.0625	0.625	0.12	0.24	0.36	0.47	0.55	0.61	0.66	0.70	0.74	0.89	>0.99
0.125	1.25	0.36	0.54	0.66	0.74	0.80	0.85	0.89	0.92	0.94	>0.99	>0.99
0.25	2.5	0.66	0.80	0.89	0.94	0.97	0.98	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
0.5	5	0.89	0.97	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
	t = 4	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	32
0.125	0.5	0.06	0.13	0.20	0.26	0.31	0.34	0.37	0.40	0.42	0.56	0.81
0.25	1	0.20	0.31	0.37	0.42	0.47	0.52	0.56	0.60	0.64	0.81	0.98
0.5	2	0.37	0.47	0.56	0.64	0.71	0.76	0.81	0.86	0.89	0.98	>0.99
1	4	0.57	0.70	0.81	0.89	0.93	0.96	0.98	0.99	>0.99	>0.99	>0.99
2	8	0.81	0.94	0.98	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
	t = 2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	32
1	2	0.18	0.21	0.24	0.27	0.31	0.35	0.39	0.42	0.46	0.64	0.91
2	4	0.24	0.31	0.38	0.46	0.53	0.59	0.65	0.70	0.74	0.91	>0.99
4	8	0.38	0.53	0.65	0.75	0.82	0.87	0.91	0.94	0.96	>0.99	>0.99
8	16	0.65	0.82	0.91	0.96	0.98	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
16	32	0.91	0.98	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
	t = 1.5	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	32
4	6	0.15	0.20	0.25	0.29	0.35	0.39	0.44	0.48	0.52	0.72	0.95
8	12	0.25	0.34	0.44	0.52	0.60	0.66	0.72	0.77	0.81	0.95	>0.99
16	24	0.44	0.60	0.72	0.81	0.88	0.92	0.95	0.97	0.98	>0.99	>0.99
32	48	0.72	0.88	0.95	0.98	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
64	96	0.95	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
	t = 1.3	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	32
8	10.4	0.13	0.17	0.20	0.24	0.28	0.32	0.36	0.39	0.43	0.61	0.89
16	20.8	0.20	0.28	0.36	0.43	0.49	0.55	0.61	0.66	0.71	0.89	>0.99
32	41.6	0.36	0.49	0.61	0.71	0.78	0.84	0.89	0.92	0.94	>0.99	>0.99
64	83.2	0.61	0.78	0.89	0.94	0.97	0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
128	166.4	0.89	0.97	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
	t = 1.2	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	32
16	19.2	0.12	0.15	0.19	0.23	0.26	0.30	0.34	0.37	0.40	0.58	0.86
32	38.4	0.19	0.26	0.33	0.40	0.47	0.52	0.58	0.63	0.68	0.86	>0.99
64	76.8	0.33	0.46	0.58	0.67	0.75	0.82	0.86	0.90	0.93	>0.99	>0.99
128	153.6	0.58	0.75	0.86	0.93	0.96	0.98	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
256	307.2	0.86	0.96	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
	t = 1.1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	16	32
64	70.4	0.12	0.16	0.20	0.24	0.27	0.31	0.35	0.38	0.42	0.59	0.88
128	140.8	0.20	0.27	0.35	0.41	0.48	0.54	0.60	0.65	0.70	0.88	>0.99
256	281.6	0.35	0.48	0.60	0.69	0.77	0.83	0.88	0.91	0.94	>0.99	>0.99
512	563.2	0.60	0.77	0.88	0.94	0.97	0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99
1024	1126.4	0.88	0.97	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99	>0.99

注1) 検出力が0.8以上について太字で示した。

2)  $t = [\text{平均2}] / [\text{平均1}]$  で、処理効果の大きさを表す。

第2表 ランダムな埋土種子分布における検出力0.8に必要な総調査種子数

処理効果 (t) <sup>1)</sup> (倍)	必要調査 種子数 <sup>2)</sup> (粒)	処理効果 (t) <sup>1)</sup> (倍)	必要調査 種子数 <sup>2)</sup> (粒)
10	9	1.3	500
8	10	1.2	1000
4	20	1.1	3500
2	70	1.05	14000

注1)  $t = [\text{平均2}] / [\text{平均1}]$ , ただし  $[\text{平均2}] > [\text{平均1}]$

2) 第1表の結果から計算した概数

## 2) サンプリングに当たって

プロット内の作土全てを埋土種子分析に供することができる場合を除いて、プロットの代表値を得るためには標本抽出＝サンプリングを行うことになる。実験の場合、プロット内の種子の分布状態については第一義的な興味の対象とならないのが普通だろう。つまり1プロットから1つの代表値が得られさえすれば事足りる。このような場合、中山ら(2011)が提案した混合サンプルから2次サンプルを得る方法が有効と考える。ここで改めてその手順を述べる。

手順1. 可能な限り多くの土壌をプロットから採取する。

手順2. 採取した土壌を必要に応じて砕土し十分に混合する。

手順3. 混合サンプルから一定量の2次サンプルを抽出し分析に供する。

ポットなどの小区画であれば、手順1でプロット内の全作土を採取するのも良いだろう。反対に同一プロットから経時的に複数のデータを得ようとする場合は、処理効果および事後の調査に影響を与えない程度の採土量とサンプリング法を採用する必要があるのは言うまでもない。経時的にサンプリングをする場合や、プロットのサイズが大きく全作土を混合することが困難な場合は、プロット内から作土の一部をコアサンプルなどでサンプリングすることになる。その際、プロット内のサンプリング位置を無作為化するのは必須である。また現実の埋土種子の空間分布は集中分布するのが一般的なもので(前記, 1)の操作により、周到的な管理を行ったとしても完全なランダム分布を実現できるのはまれであろう), コアサンプルは、小さな容量のものを用いて多くの箇所から土壌を採取する方が、大きな容量のサンプルで少数の箇所から採取するよりも効率がよい。

また、手順2で土壌を混合するのは、混合サンプル内の種子分布をランダム化するためのものであるが、土壌粒子と雑草種子の比重の違い等が原因となり混合サンプル内の種子分布に偏りを生ずる場合があるかもしれない。そのような事態にそなえて、手順3の2次サンプルの抽

出は、混合サンプル全体から少量ずつまんべんなく取ることが進められる。

## 3) 分析結果を見て

一通り分析が終わり、データが得られた段階で、当初想定していたよりも種子量が少ない、あるいは同一処理を施したプロット間の種子量データのバラツキが大きいということがあると、検出力が低下してしまい処理効果の大きさは想定通りであったとしても、検定結果としては有意にならない場合がある。そうした場合は、2)の手順3を繰り返し、複数回の測定結果の合計値をプロットの代表値にすると、1)で述べたのと同様に平均値が大きくなることで検出力が高まり、統計的に有意な差として検出できることもある。もちろん、プロット間の分散が極端に大きい場合は、別途、追加実験を行い反復数を増やすことが必要になる場合もあるだろう。また処理効果が想定以下であった場合は、処理効果自体の専門的有意性を再検討した上で、専門的有意性がないと結論し実験を打ち切るか、追加の実験を行うかすることになる。

## おわりに

本稿では、埋土種子調査を伴う実験の必要反復数を、ランダムな種子分布を仮定した上で、最も単純な1因子2水準の場合に絞って考えた。これは、集中分布する埋土種子集団および多因子、多水準の実験では、検出力を算出する際の条件設定が多岐にわたり、想定可能な全ての組み合わせについて検出力を検討することが不可能であったことによる。

1因子の実験であれば、3水準以上でも、実験の目的によっては2つの平均値間の検定を繰り返し適用できる場合もある(標準区との比較にのみ興味がある場合など)。また多因子実験でも、釣り合い型の実験計画であれば、ここでの検討結果をそのまま利用可能な場合もある。しかし、ここでの検討は限られた条件の中でのものであり、適用場面も自ずと限られる。実際の実験計画においては、因子数、水準数、考慮すべき交互作用項など条件設定がある程度絞られた段階で、実験計画と供試圃場の種子分布を考慮したシミュレーション実験を行うことも有益であろう。

埋土種子に関わる研究は、その分析に多くの人手と時間を要するなど様々な制約があり、現状では気軽に取り組めるものでないかもしれない。しかし、当然のことながら多くの耕地雑草の発生源は埋土種子である。従って、本来、その把握は雑草研究の基本中の基本とすべきものである。特に、今後、様々な抑草手段を組み合わせた総合的雑草管理が導入される中で、長期的な雑草管理、耕地利用を考える時、埋土種子の動態を把握することは

ますます重要性を増してくるはずである。本稿により、埋土種子研究における制約のいくらかでもが軽減できればと期待する。

#### 引用文献

- 浅井元朗・大段秀記・市原 実・石田義樹 2010. 麦作における難防除雑草の埋土種子調査法. 雑草研究 55 : 218 - 227.
- 小林浩幸・渡邊寛明 2010. 雑草研究における埋土種子調査の目的と手法. 雑草研究 55 : 194 - 207.
- Leck, M. A., V. T. Parker and R. L. Simpson 1989. Ecology of Soil Seed Banks. Academic Press, San Diego, pp. 461.
- 中山壮一・柴田泰宙・浅井元朗 2011. 埋土種子調査のた  
めのサンプリング計画. 雑草研究 56 : 53 - 61.
- 大東健太郎 2011. 研究の流れの中での実験計画とデータ解析の位置づけ：より効率的な研究のために. 雑草研究 56 : 35 - 42.
- R Development Core Team 2010. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org>.
- 澁谷知子・中谷敬子・中山壮一・小林浩幸 2010. ダイズ作における重要雑草の埋土種子調査法. 雑草研究 55 : 208 - 217.
- 住吉 正・小荒井晃・川名義明・牛木 純・赤坂舞子・渡邊寛明 2011. 水稻作における難防除雑草の埋土種子調査法. 雑草研究 56 : 43 - 52.

(2011年8月26日受理)